Denisia 13 | 17.09.2004 | 435-442

Phylogenetische Analyse der 18S rRNA identifiziert den parasitischen Protisten *Nephridiophaga blattellae* (Nephridiophagidae) als Vertreter der Zygomycota (Fungi)[1]

C. WYLEZICH, R. RADEK & M. SCHLEGEL

Abstract: Phylogenetic analysis of 18S rRNA identifies the parasitic protist *Nephridiophaga blattellae* (Nephridiophagidae) as a member of fungi. — The taxonomic affiliation of the spore-forming, unicellular nephridiophagids that thrive in the Malpighian tubules of insects is still completely unresolved. Their morphological and ultrastructural characters do not closely resemble any known taxon of spore-forming protists. Some authors classed them with the Haplosporidia but proof is poor; e.g. the typical haplosporosomes are missing in nephridiophagids. In the present examination, the 18S rRNA of *Nephridiophaga blattellae* (from the German cockroach *Blattella germanica*) was amplified and sequenced in order to reconstruct the phylogenetic relationships of that group. Results exclude a close relation to haplosporidia. Data rather support their classification within the fungi. Morphological findings such as the presence of chitin also argue in favour of this hypothesis. According to our analysis the exact position of nephridiophagids seems to be near to the Zygomycota, as it is also reported for microsporidia.

Key words: Nephridiophagidae, phylogeny, Zygomycota, Microsporidia, 18S rRNA.

Einleitung

Die Nephridiophagidae SPRAGUE 1970 sind mikroskopisch kleine, einzellige, Sporen formende, heterotrophe Organismen, die in den Malpighischen Gefäßen von Insekten leben (z. B. RADEK & HERTH 1999), aber relativ harmlos sind. Im Entwicklungszyklus finden sich verschiedene Lebensstadien. Die vielkernigen, vegetativen Plasmodien kommen extrazellulär – oder bei einigen Arten auch intrazellulär – im Lumen der Malpighischen Gefäße vor. Sporogonie findet ebenfalls im Wesentlichen dort statt, wobei durch eine innere Abgrenzung in den Sporen bildenden Plasmodien etwa 10-35 flache, ovale Sporen entstehen. Junge Sporoblasten mit zwei oder vier Kernen kommen vor; reife Sporoblasten sind dagegen fast immer einkernig (siehe Abbildungen 1-3).

Aus Schaben sind bislang vier relativ wirtsspezifische Arten der Gattung *Nephridiophaga* bekannt: *N. blattellae* CRAWLEY 1905 (*Coelosporidium*) aus *Blattella germanica* LINNAEUS 1767 (*Blatta*) (CRAWLEY 1905; WOOLEVER 1966; RADEK & HERTH 1999), *N. periplanetae* LUTZ & SPLENDORE 1903 (*Plistophora*) aus *Blatta orientalis* LINNAEUS 1758, *Periplaneta americana* LINNAEUS 1758 (*Blatta*) und *P. brunnea* BURMEISTER 1838 (LUTZ & SPLENDORE 1903; LANGE 1993), *N.* (*Coelosporidium*) *tangae* PURRINI, WEISER & KOHRING 1988 aus *Blatta* sp. (PURRINI et al. 1988; LANGE 1993) sowie *N. blaberi* (FABEL, RADEK & STORCH 2000, die kürzlich erstmals aus der Totenkopfschabe *Blaberus craniifer* BURMEISTER 1838 (*Blabera*) beschrieben wurde. Nach RADEK & HERTH (1999) gehören wie bereits von LANGE (1993) vorgeschlagen drei weitere Gattungen zu den Nephridiophagidae: *Coleospora* GIBBS 1959, *Oryctospora* PURRINI & WEISER 1990 und *Peltomyces* LEGER 1909, welche ausschließlich in Käfern (Coleoptera) vorkommen. Dieses Taxon scheint eine monophyletische Gruppe zu sein. Über ihre nächsten Verwandten herrscht hingegen vollkommene Unklarheit (z. B. LANGE 1993; RADEK & HERTH 1999). Einige Autoren (z. B. KOWALJOWA & ISSI 1973) beschrieben Mitglieder der Nephridiophagidae lichtmikroskopisch als Microsporidia. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten jedoch, dass den Nephridiophagidae ein Polfaden sowie die charakteristische, posterior lokalisierte Vakuole der Microsporidia fehlen. Andere Autoren (z. B. SPRAGUE 1970) stellten sie hingegen – teilweise ohne Angabe von Gründen – zu den Haplosporidia (Alveolata). Die Nephridiophagidae weisen allerdings keine Haplosporosomen auf; die Sporenwandbildung unterscheidet sich ebenfalls deutlich bei beiden Gruppen. Vielmehr zeigte die Einbeziehung der Elektronenmikroskopie deutlich,

[1] Wir widmen diese Studie unserem hochverehrten Kollegen Herrn Univ.-Prof. Dr. Horst Aspöck anlässlich seines 65. Geburtstages in Anerkennung seiner hohen, überaus umfangreichen und breit gefächerten wissenschaftlichen Verdienste.

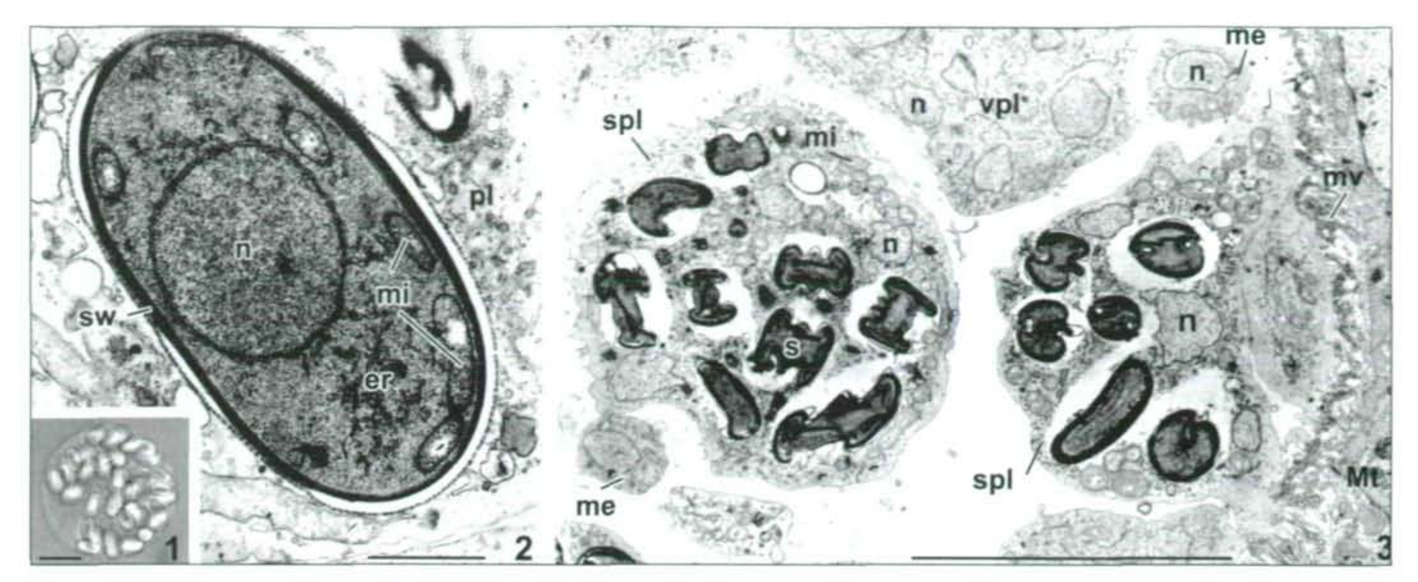


Abb. 1-3: Stadien im Lebenszyklus von *Nephridiophaga blattellae*. (1) Reife Sporen im Sporenplasmodium (Interferenzkontrast, Maßstab 10µm); (2) Sporoblast innerhalb eines Sporenplasmodiums (pl; n: Nucleus, mi: Mitochondrien, er: Endoplasmatisches Reticulum, sw: Sporenhülle; TEM, Maßstab 1µm); (3) Malpighischer Tubulus (Mt) mit mehreren Parasitenstadien: einkernige Merozoiten (me), vegetative Plasmodien (vpl), Sporenplasmodien (spl) mit Sporen (s; mi: Mitochondrien, n: Nuclei, mv: Microvilli; TEM, Maßstab 10µm).

dass die Sporen der Nephridiophagidae keine typischen Charakteristika anderer Sporen bildenden Taxa aufweisen (z. B. LANGE 1993; RADEK & HERTH 1999; siehe hierzu auch Tabelle 1).

Um nun die phylogenetischen Beziehungen der Nephridiophagidae zu anderen Einzellern zu untersuchen, wurde das 18S rRNA-Gen von *Nephridiophaga blattellae* sequenziert und phylogenetisch analysiert.

Material und Methoden

Sporen von *Nephridiophaga blattellae* wurden aus Kulturen der Deutschen Schabe *Blattella germanica* gewonnen (Herkunft: Umweltbundesamt Berlin). Um die Sporen zu erhalten, wurde der Darm aus den dekapitierten Schaben gezogen und die Malpighischen Gefäße auf Objektträgern in destilliertem Wasser zerzupft. Sporen wurden unter mikroskopischer Kontrolle (inverses Zeiss Mikroskop) mittels einer feinen Glaspipette gesammelt und in 80 % Ethanol bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Ebenso wurden Sporen von *Nephridiophaga blaberi* aus der Totenkopfschabe *Blaberus craniifer* isoliert.

Der Alkohol wurde entfernt und die genomische DNA nach dem Protokoll von KAVENOFF & ZIMM (1973, modifiziert nach STEINBRÜCK & SCHLEGEL 1983) isoliert. Das 18S rRNA-Gen wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden 1-20 ng DNA mit je 0,1 µM der Eukaryoten-spezifischen Primer (MEDLIN et al. 1988), 200 µM dNTPs sowie 1x PCR-Puffer und 1 unit Taq-DNA Polymerase (SIGMA, München, Deutschland) gemischt. Das Endvolumen von 50 µl wurde mit einem Volumen Mineralöl überschichtet. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 95 °C vorgeheizt und weiterhin für 35 Zyklen (92 °C 60 s, 40 °C 90 s, 72 °C 120 s) sowie abschließend eine Stunde bei 72 °C inkubiert. Das PCR Produkt wurde gereinigt (Microcon-30, AMICON, Witten, Deutschland) und in den pGEM-T-Vektor (PROMEGA, Mannheim, Deutschland) ligiert. Mit den erhaltenen Plasmiden wurden kompetente *E. coli* (JM 109) transformiert. Rekombinante Plasmide wurden mit einer Thermo Sequenase (AMERSHAM, Braunschweig, Deutschland) sequenziert und die DNA-Fragmente in einem automatischen Sequenzierer (LI-COR, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) aufgetrennt. Beide Stränge wurden komplett in überlappender Weise mit markierten M13- und internen Primern (WYLEZICH et al. 2002) sequenziert.

Die mit den verschiedenen Primern erhaltenen Sequenzfragmente wurden mit dem Programm DNASIS, Version 7.0 (HITACHI Software / Pharmacia) verknüpft. Die ermittelte Sequenz wurde mit Hilfe von ClustalX, Version 1.81 (THOMPSON et al. 1999) zu Sequenzen verschiedener Eukaryoten-Taxa einschließlich der Fungi aligniert. Die Datensätze wurden auf konservierte, gut homologisierbare Bereiche reduziert (1274 Positionen im Eukaryoten-Aligment, 1600 Positionen im Fungi-Alignment). Phylogenetische Stammbäume wurden unter Anwendung der Maximum-Likelihood-Methode (Tree-Puzzle, Version 5.0, STRIMMER & VON HAESELER 1996) nach dem Modell HKY85 (HASEGAWA et al. 1985) rekonstruiert. Weiterhin wurden die Distanz-Matrix- und Minimum-Evolution-Methode (Mega, Version 2.1 KUMAR et al. 2001) mit jeweils 1000 Bootstrap-Replikationen angewandt (Kimura-2-Parameter-Modell, KIMURA 1980). Dabei wurden verschiedene Taxa als Außengruppenvertreter verwendet. Zusätzlich wurden verschiedene alternative Stammbaumtopologien anhand des im Programm Puzzle enthaltenen Kishino-Hasegawa-Tests (KISHINO & HASEGAWA 1989) untersucht.

Taxon	Den Nephidiophagidae fehlende Merkmale	Wirtsspektrum	Chitin	Referenzen für Zuordnung der Nephridiophagidae zu entsprechendem Taxon
Apicomplexa	Apikalkomplex, Pellicula	Invertebraten (Arthropoda), Vertebrata	-	Keine
Haplosporidia	Haplosporosomen, Sporenwandbildung durch umwachsendes Episporen-Cytoplasma	Invertebraten (Mollusken)	-	PURRINI & WEISER 1990 SPRAGUE 1970 WOOLEVER 1966
Microsporidia	Polfaden, Polaroplast, posteriore Vakuole	Invertebraten, Vertebrata	+	KOWALJOWA & ISSI 1973 PERRIN 1905
Myxozoa	Polkapseln, mehrzellige Sporen	Vertebrata / Anneliden	+	Keine
Zygomycota (Fungi)	Hyphen, Haustorien, asexuelle (Sporangiosporen) und sexuelle Sporen (Zygosporen)	(teilweise) Invertebraten, Fungi	+	Keine

Tab 1: Charakterisierung der Sporen formenden Taxa (Sporen meist unbeweglich, parasitisch lebend), zu denen die Nephridiophagidae möglicherweise in verwandtschaftlicher Beziehung stehen könnten.

Ergebnisse

Von *Nephridiophaga blaberi* konnte keine 18S rRNA-Sequenz ermittelt werden, da alle sequenzierten Plasmide nur die 18S rRNA-Gensequenz des Wirtes *B. craniifer* enthielten, wie eine Genbank-Recherche im Internet (Blast-Suche) ergab. Dies ist vermutlich auf die niedrige Infektionsrate der Schaben zurückzuführen.

Die ermittelte Gensequenz von *Nephridiophaga blattellae* (Genbank-Zugangsnummer: AY 603958) weist eine Länge von 1807 bp auf. Der G/C-Gehalt beträgt 48,1 %. Eine Genbank-Recherche ergab die größte Übereinstimmung der ermittelten Gensequenz mit 18S rRNA-Sequenzen von Pilz-Vertretern. In Abbildung 4 ist ein Neighbor-Joining-Stammbaum zur Phylogenie von *N. blattellae* innerhalb der Eukaryoten dargestellt. Die Verzweigung des Minimum-Evolution-Stammbaumes stimmt im Wesentlichen mit dem in Abbildung 4 gezeigten Stammbaum überein. Wie schon die Genbank-Recherche vermuten lässt, steht *N. blattellae* hier innerhalb der Fungi. *Nephridiophaga blattellae* zweigt in einer Multifurkation mit den meisten Fungi-Vertretern ab. Um die genaue Position zu untersuchen, wurden mittels eines Kishino-Hasegawa-Tests verschiedene Hypothesen überprüft. Abbildung 5 zeigt den besten Stammbaum, der mit Hilfe dieses Tests gefunden werden konnte (entspricht Hypothese [1] in Tabelle 2). *Nephridiophaga blattellae* bildet hier das Schwestertaxon des ‚uncultured rhizosphere zygomycete'-Isolates innerhalb der Zygomycota-Vertreter (*S. depressa*, *R. variabilis*, *M. racemosus*). Weiterhin wurden folgende Hypothesen untersucht: [2] *N. blattellae* zweigt an der Basis aller Fungi ab; [3] *N. blattellae* stellt das Schwestertaxon der Haplosporidia dar; [4] *N. blattellae* (+ Haplosporidia) ist die Schwestergruppe der Alveolata; [5] *N. blattellae* (+ Haplosporidia) ist die Schwestergruppe der Fungi. Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, wird dabei einzig Hypothese [2] als nicht signifikant schlechter bewertet. Alle Hypothesen, in denen *N. blattellae* bei den Haplosporidia steht, werden dagegen immer als signifikant schlechter bewertet. Eine mögliche nähere Verwandtschaft der Nephridiophagidae zu den Microsporidia kann anhand der 18S rRNA nicht nachgewiesen werden, da deren 18S rRNA-Gene eine sehr hohe Evolutionsgeschwindigkeit aufweisen und kaum Übereinstimmungen zu anderen eukaryotischen 18S rRNA-Genen aufweisen (z. B. VOSSBRINCK et al. 1987).

Hypothese	Log L	Differenz	Standardfehler	Signifikant schlechter?
[1]	-15554.03	Bester Stammbaum		
[2]	-15592.50	38.47	20.74	Nein
[3]	-15639.67	85.64	31.14	Ja
[4]	-15650.14	85.64	32.55	Ja
[5]	-15619.50	65.46	30.79	Ja

Tab 2: Ergebnis des Kishino-Hasegawa-Tests. Hypothese [1] entspricht dem Stammbaum in Abbildung 5. Folgende weitere Stammbaumhypothesen zur phylogenetischen Position von *Nephridiophaga blattellae* innerhalb der Eukaryoten wurden untersucht:
[2] *N. blattellae* an der Basis aller Fungi
[3] *N. blattellae* als Schwestertaxon der Haplosporidia
[4] *N. blattellae* (+ Haplosporidia) als Schwestergruppe der Alveolata
[5] *N. blattellae* (+ Haplosporidia) als Schwestergruppe der Fungi

Hypothese	Log L	Differenz	Standardfehler	Signifikant schlechter?
[1]	-11465.44	Bester Stammbaum		
[2]	-11495.29	29.85	10.86	Ja
[3]	-11473.97	8.53	8.77	Nein

Tab 3: Ergebnis des Kishino-Hasegawa-Tests. Hypothese [1] entspricht dem Stammbaum in Abbildung 6. Folgende weitere Stammbaumhypothesen zur phylogenetischen Position von *Nephridiophaga blattellae* innerhalb der Fungi wurden untersucht:
[2] *N. blattellae* mit ‚uncultured rhizosphere zygomycete' als Schwestergruppe der Entomophthorales
[3] *N. blattellae* mit ‚uncultured rhizosphere zygomycete' als Schwestergruppe der Zoopagales

Um die genauere Position von *N. blattellae* innerhalb der Pilze zu untersuchen, wurden Stammbäume ausschließlich mit Fungi- (ohne Abbildung), bzw. Zygomycota-Sequenzen durchgeführt. Hierzu wurden ebenfalls verschiedene Hypothesen untersucht. In Abbildung 6 (ausschließlich Zygomycota-Vertreter) ist der beste gefundene Stammbaum abgebildet (entspricht Hypothese [1] in Tabelle 3). Hier zweigt *N. blattellae* – wiederum zusammen mit dem ‚uncultured rhizosphere zygomycete'-Isolat – als Schwestergruppe zur Entomophthorales-Mucorales-Gruppierung ab. Mittels eines Kishino-Hasega-

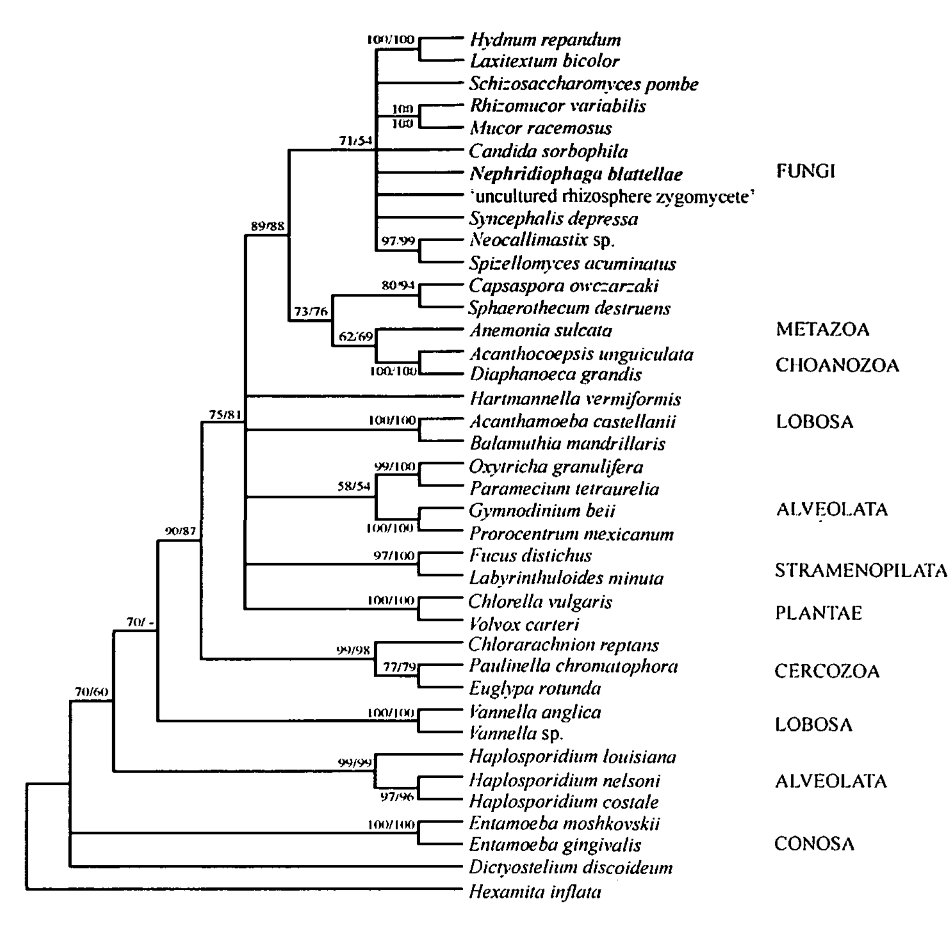


Abb. 4: Konsensus-Stammbaum (Neighbor-Joining-Methode) zur phylogenetischen Stellung von *Nephridiophaga blattellae* (fett) innerhalb der Eukaryoten. Der Stammbaum wurde mit dem Programm Mega (Evolutionsmodell Kimura-2-Parameter) erstellt. Die an den Verzweigungen angegebenen Werte entsprechen den Bootstrap-Werten für 1000 Replikationen (in %, NJ/ME). Als Außengruppe wurde *Hexamita inflata* gewählt. Genbankzugangsnummern der verwendeten Arten: *Acanthamoeba castellanii* U07413, *Acanthocoepsis unguiculata* L10823, *Anemonia sulcata* X53498, *Balamuthia mandrillaris* AF019071, *Candida sorbophila* AB018151, *Capsaspora owczarzaki* AF436889, *Chlorarachnion reptans* X70809, *Chlorella vulgaris* X13688, *Diaphanoeca grandis* L10824, *Dictyostelium discoideum* K02641, *Entamoeba gingivalis D28490*, *Entamoeba moshkovskii* AF149906, *Euglypha rotunda* AJ418783, *Fucus distichus* AB011423, *Gymnodinium beii* U41087, *Haplosporidium costale* AF387122, *Haplosporidium louisiana* U47851, *Haplosporidium nelsoni* U19538, *Hartmannella vermiformis* M95168, *Hexamita inflata* L07836, *Hydnum repandum* AF026641, *Labyrinthuloides minuta* L27634, *Laxitextum bicolor* AF026605, *Mucor racemosus* X54863, *Neocallimastix* sp. M59761 *Oxytricha granulifera* X53486, *Paramecium tetraurelia* X03772, *Paulinella chromatophora* X81811, *Prorocentrum mexicanum* Y16232, *Rhizomucor variabilis* AF113435, *Schizosaccharomyces pombe* X58056, *Sphaerothecum destruens* L29455, *Spizellomyces acuminatus* M59759, *Syncepahils depressa* AB016011, *Vannella anglica* AF099101, *Vannella* sp. (nicht veröff.), *Volvox carteri* AF183490, ‚uncultured rhizosphere zygomycete' AJ506030. Die beiden Vertreter der Mesomycetozoea (*Capsaspora owczarzaki* und *Sphaerothecum destruens*) werden hier als Fungi bezeichnet; ihre genaue systematische Stellung ist bislang jedoch nicht klar.

wa-Tests wurde eine mögliche Zugehörigkeit zu den parasitischen Entomophthorales (Hypothese [2] in Tabelle 3) und Zoopagales (Hypothese [3] in Tabelle 3) untersucht. Die ebenfalls parasitischen Dimargaritales wurden von einer Analyse ausgeschlossen, da ihre 18S rRNA eine beträchtlich höhere Evolutionsgeschwindigkeit als die der anderen Zygomycota aufweist (TANABE et al. 2000). Eine mögliche Verwandtschaft von *N. blattellae* zu den Entomophthorales (Hypothese [2] in Tabelle 3) wird dabei als signifikant schlechter bewertet. Im Gegensatz dazu ist die Zugehörigkeit zu den Zoopagales (Hypothese [3] in Tabelle 3) nicht auszuschließen.

Diskussion

Nach dieser ersten hier vorgestellten molekularbiologischen Untersuchung evolvierten die Nephridiophagidae innerhalb einer Gruppe der Fungi: der Zygomycota (Abbildungen 4-6). Eine nähere verwandtschaftliche Beziehung zu den Haplosporidia, wie sie beispielsweise von PURRINI & WEISER (1990) vorgeschlagen wurde, kann anhand der Sequenzdaten unwahrscheinlich gemacht werden. Wie ein Kishino-Hasegawa-Test zeigt, werden diesbezügliche Stammbaumtopologien als signifikant schlechter bewertet (Hypothese [3], [4] und [5] in Tabelle 2). Die Nephridiophagidae unterscheiden sich von den Haplosporidia außerdem durch eine Vielzahl von Charakteristika, wie z. B. das Fehlen von Haplosporosomen, der Art und Weise der Sporenwandbildung, dem Wirtsspektrum und Habitat (PURRINI et al. 1988; RADEK & HERTH 1999), so dass dieses Resultat nicht überrascht. Weiterhin wurde bei den Nephridiophagidae – wie bei den Microsporidia (z. B. KEELING 2003) – Chitin in der Sporenwand nachgewiesen (RADEK et al. 2002), während es hierfür bei den Haplosporidia keine Hinweise gibt.

Die tatsächliche Zugehörigkeit von Protistentaxa zu den Pilzen ist nicht neu: so wie die früher als farblose Grünalgen betrachtete Gattung *Hyaloraphidium* PASCHER & KORSHIKOV 1931 zu den Pilzen gehört (zu Chytridiomycota, USTINOVA et al. 2000), sind auch die Microsporidia abgeleitete Pilze und entwickelten sich vermutlich aus Vorfahren der Zygomycota (z. B. HIRT et al. 1999, KEELING 2003). Die phylogenetische Zugehörigkeit der Nephridiophagidae zu Vertretern der Fungi ist dagegen zunächst unerwartet und wurde bisher nicht in Betracht gezogen, da auf den ersten Blick keine offensichtlichen Ähnlichkeiten zu erkennen sind. Bei gezielterer Betrachtung können jedoch durchaus morphologische Hinweise für eine Verwandtschaft gefunden werden. Wie bereits erwähnt, kommt in der Sporenwand Chitin vor, was allerdings auch bei einigen anderen Protisten zu finden ist (z. B. in der Lorica einiger Ciliaten, MULISCH 1993). Die Nephridiophagidae besitzen jedoch Vesikel nahe der Sporenwandoberfläche, wel-

che möglicherweise dem Transport der Chitinsynthetase dienen und den Chitosomen der Pilze vergleichbar sein könnten (RADEK et al. 2002). Ein Flagellatenstadium weisen die Nephridiophagidae ebenso wie die meisten Fungi-Gruppen (mit Ausnahme der Chytridiomycota, welche ein posteriores Flagellum besitzen) nicht auf (BEAKES 1998). Den Zygomycota und anderen Pilzvertretern (ausgenommen Chytridiomycota) fehlt ein gestapelter Golgiapparat (USTINOVA et al. 2000), was ebenso für die Nephridiophagidae gilt (RADEK & HERTH 1999; FABEL et al. 2000). Demgegenüber sind etliche Unterschiede in Lebensweise und Morphologie zwischen Zygomycota und Nephridiophagidae vorhanden (siehe Tabelle 1). Auch haben die Nephridiophagidae nicht wie die Pilze abgeflachte, sondern tubuläre Mitochondriencristae (RADEK & HERTH 1999).

Dennoch ist davon auszugehen, dass es sich bei der ermittelten Gensequenz nicht um eine Pilzkontamination handelt. Zwar kommen Pilze auch natürlicherweise in den Malpighischen Gefäßen von Insekten vor, jedoch handelt es sich diesbezüglich bei Schaben mehrheitlich um Ascomycota-Vertreter (ROTH & WILLIS 1960). Mikroskopisch sind bei der Präparation der Sporen keine Hyphen oder andere Stadien von Pilzen (bzw. Parasiten) aufgefallen.

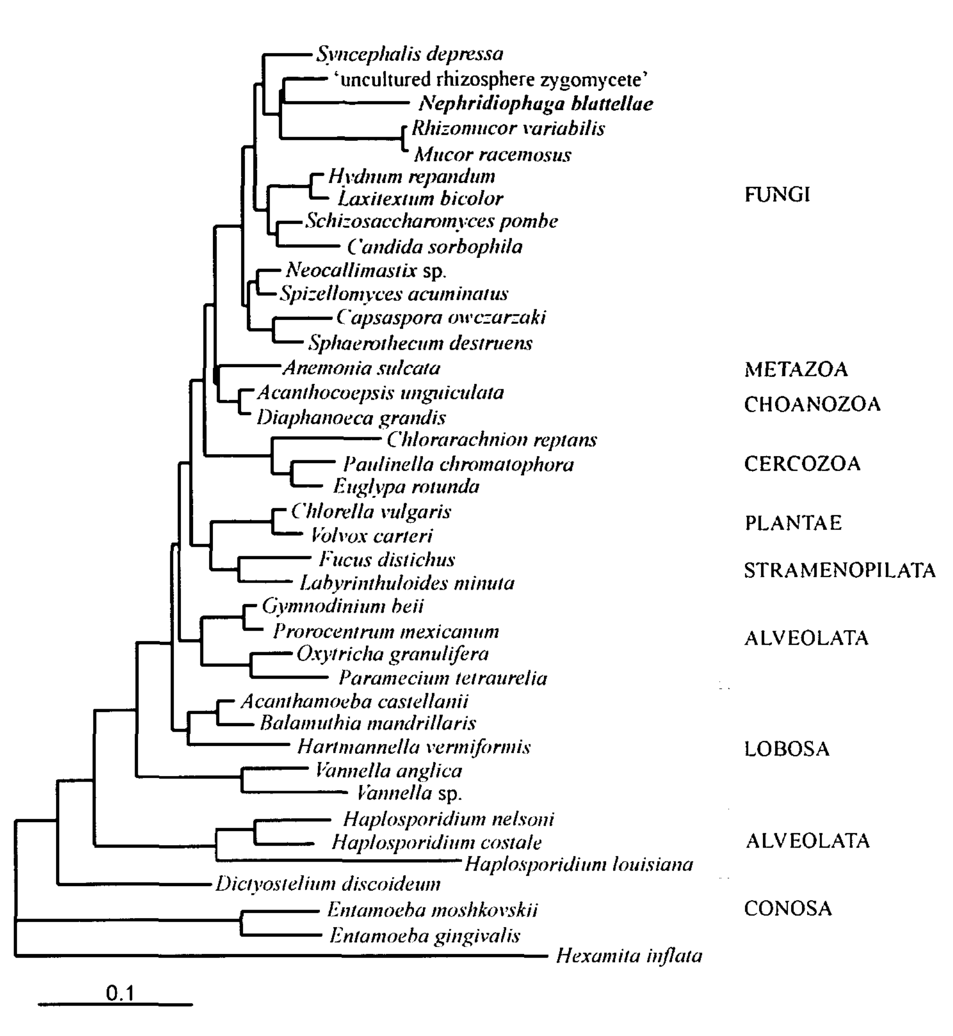


Abb. 5: Dargestellt ist der beste Stammbaum des Kishino-Hasegawa-Testes (Puzzle), welcher Hypothese [1] in Tabelle 2 entspricht. Untersucht wurde die phylogenetische Stellung von *Nephridiophaga blattellae* (fett) innerhalb der Eukaryoten. Als Außengruppe wurde *Hexamita inflata* gewählt. Der angegebene Maßstab entspricht 0,1 Substitutionen pro Position. (Genbankzugangsnummern der verwendeten Arten siehe Abb. 4)

Eine mögliche nahe Verwandtschaft zwischen den Nephridiophagidae und den zu den Pilzen gehörenden Microsporidia ist nicht gänzlich auszuschließen (z. B. KOWALJOWA & ISSI 1973). Ähnlichkeiten zwischen Nephridiophagidae und Microsporidia findet man beispielsweise im Aufbau der Sporenwand. Die Sporen beider bestehen aus zwei Hauptschichten (Endo- und Exospore), von denen die innere chitinhaltig ist (RADEK et al. 2002; VAVRA 1976). Die Exospore der Microsporidia besteht größtenteils aus Proteinen; Proteine sind vermutlich auch bei den Nephridiophagidae Bestandteile der Sporenwand (RADEK et al. 2002). Einen gestapelten Golgiapparat weisen die Microsporidia ebenso wie die Nephridiophagidae nicht auf (CANNING 1998). Die Microsporidia zeigen eine geschlossene, intranukleäre Pleuromitose (Spindelhälften liegen in bestimmtem Winkel zueinander, CANNING 1998) wie auch die Zygomycota und Haplosporidia (RAIKOV 1994). Eine geschlossene Mitose ist bei Pilzen weit verbreitet (BEAKES 1998). Bei den Nephridiophagidae wurden ebenfalls Mikrotubuli im Inneren des Kerns bei unversehrter Kernhülle beobachtet; die Spindelpolkörper liegen sich jedoch gegenüber und inserieren nicht an der Kernhülle (RADEK & HERTH 1999).

Eine nähere Verwandtschaft der Nephridiophagidae zu den Microsporidia kann anhand der 18S rRNA allerdings nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine eventuelle Verwandtschaft zu den parasitischen Entomophthorales (Zygomycota) untersucht, in deren Nähe auch die Microsporidia stehen (KEELING 2003). Diese Hypothese wird allerdings als signifikant schlechter bewertet (Hypothese [2] in Tabelle 3). Nach den bisherigen Analysen muss daher angenommen werden, dass die Nephridiophagidae nicht näher mit den Microsporidia verwandt sind. Eine weitere Hypothese, eine mögliche Zugehörigkeit von *N. blattellae* zu den Zoopagales (einer ebenfalls parasitisch lebende Gruppe der Zygomycota, TANABE et al. 2000), ist anhand der bisherigen Sequenzdaten nicht auszuschließen (Hypothese [3] in Tabelle 3).

Ein Grund dafür, dass sich die ermittelte Gensequenz von *N. blattellae* nicht eindeutig einer Gruppe der Pilze, bzw. Zygomycota zuordnen lässt, könnte der zu geringe phylogenetische Informationsgehalt sein. Sowohl die Mi-

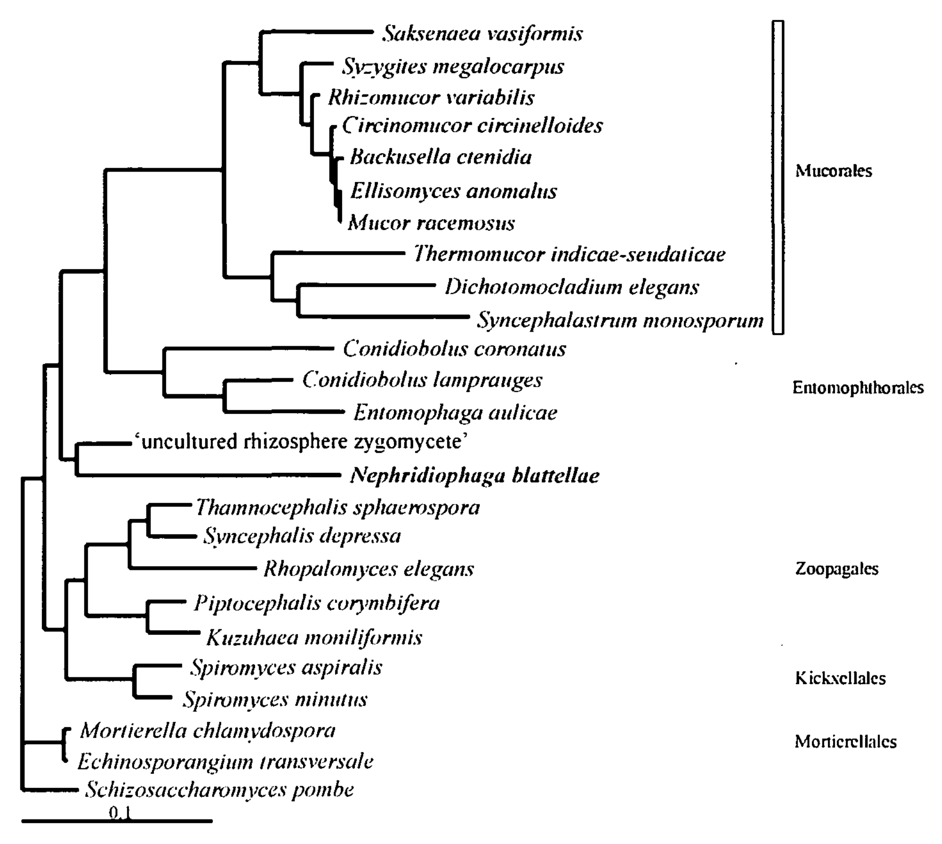


Abb. 6: Dargestellt ist der beste Stammbaum des Kishino-Hasegawa-Testes (Puzzle), welcher Hypothese [1] in Tabelle 3 entspricht. Untersucht wurde die phylogenetische Stellung von *Nephridiophaga blattellae* (fett) innerhalb der Zygomycota. Als Außengruppe wurde *Schizosaccharomyces pombe* gewählt. Der angegebene Maßstab entspricht 0,1 Substitutionen pro Position. Genbankzugangsnummern der zusätzlich verwendeten Arten: *Backusella ctenidia* AF157122, *Conidiobolus coronatus* D29947, *Conidiobolus lamprauges* AF113420, *Circinomucor circinelloides* AF157129, *Dichotomocladium elegans* AF157131, *Echinosporangium transversale* AF113424, *Ellisomyces anomalus* AF157134, *Entomophaga aulicae* U35394, *Kuzuhaea moniliformis* AB016010, *Mortierella chlamydospora* AF157143, *Piptocephalis corymbifera* AB016023, *Rhopalomyces elegans* AB016012, *Saksenaea vasiformis* AF113442, *Spiromyces aspiralis* AF007543, *Syncephalastrum monosporum* AF157161, *Syzygites megalocarpus* AF157162, *Thamnocephalis sphaerospora* AB016013, *Thermomucor indicae-seudaticae* AF157165.

crosporidia als auch die Zygomycota (und Chytridiomycota, BULLERWELL et al. 2003) weisen hohe Substitutionsraten auf, wodurch Sättigungseffekte eingetreten sein könnten und das phylogenetische Signal zumindest zum Teil verrauscht ist. Möglich wäre auch, dass im Datensatz Schlüsselarten fehlen, deren Einbeziehung für die Detektion einer solchen Verwandtschaft erforderlich ist. Innerhalb der Pilze zählen die Zygomycota (und Chytridiomycota, BULLERWELL et al. 2003) zu den mit molekularen Merkmalen bisher am wenigsten charakterisierten Gruppen. Zudem erscheinen die Zygomycota häufig polyphyletisch, und eine klare Separation zwischen Zygomycota und Chytridiomycota ist oftmals nicht gegeben (JENSEN et al. 1998; TANABE et al. 2000; VOIGT & WÖSTEMEYER 2001), was ebenfalls auf die hohe genetische Diversität und den relativ geringen Probenumfang zurückzuführen ist.

Fehlende Hinweise auf eine mögliche Verwandtschaft von Microsporidia und Nephridiophagidae anhand der 18S rRNA-Sequenzvergleiche sind möglicherweise in der hohen Spezialisierung der Microsporidia an die parasitische Lebensweise begründet. Es hat sich gezeigt, dass die 18S rRNA, wie bereits erwähnt, bei hoch adaptierten Parasiten unverhältnismäßig schnell evolviert und daher für eine phylogenetische Einordnung nur schlecht zu verwenden ist. Diese hohe Spezialisierung der Microsporidia zeigt sich auch in der Morphologie ihrer Sporen: sie sind optimal für die Infektion von Wirtszellen ausgestattet (intrazelluläre Injektion des infektiösen Sporoplasmas mithilfe von Polfaden, Polaroplast und posteriorer Vakuole). Spezielle Vorrichtungen zum Befall von Wirtszellen sind bei den Nephridiophagidae nicht vorhanden (zudem meist extrazelluläre Lebensweise). Sie verankern sich lediglich mittels Pseudopodien zwischen den Mikrovilli der Epithelzellen in den Malpighischen Tubuli (RADEK & HERTH 1999). Auch ihre Pathogenität und die Auswirkungen auf Wirtstiere sind eher gering (LANGE et al. 1993; FABEL et al. 2000; PURRINI und WEISER 1990). Möglicherweise sind die Nephridiophagidae phylogenetisch jüngere Parasiten (bzw. Kommensalen) als die Microsporidia.

Die exakte phylogenetische Position von *Nephridiophaga blattellae* innerhalb der Pilze kann derzeit aufgrund der bisherigen Datengrundlage nicht genauer detektiert werden. Hierzu müssten weitere Arten der Nephridiophagidae (was auch zur Verifizierung der bisher ermittelten Gensequenz von *N. blattellae* vorteilhaft ist), bzw. Sequenzen anderer Gene in eine solche Untersuchung einbezogen werden.

Danksagung

Wir danken Frau Warun Schier für die hervorragende technische Assistenz bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Zusammenfassung

Die taxonomische Zuordnung der Sporen formenden, einzelligen Nephridiophagidae, die in den Malpighischen Gefäßen von Insekten leben, war bislang völlig ungewiss und anhand morphologischer und ultrastruktureller Merkmale nicht aufzuklären. So zeigen ihre Sporen nicht die typischen Charakteristika anderer Sporen bildender Einzeller. Einige Autoren stellten sie zu den Haplosporidia, obwohl auch hierfür keine überzeugenden Hinweise zu finden sind, beispielsweise fehlen den Nephridiophagidae die bezeichnenden Haplosporosomen der Haplosporidia.

Um die stammesgeschichtliche Herkunft dieses Taxons zu rekonstruieren, wurde die 18S rRNA von *Nephridiophaga blattellae* (aus der Deutschen Schabe *Blattella germanica*) amplifiziert und sequenziert. Nach dieser ersten molekularbiologischen Untersuchung erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die Nephridiophagidae näher mit den Haplosporidia verwandt sind. Viel mehr deuten die Daten darauf hin, dass sie ihren evolutiven Ursprung innerhalb der Pilze haben. Dies wird auch durch morphologische Befunde gestützt: in der Sporenwand ist das Vorkommen von Chitin nachgewiesen. Die genaue Position des Taxons ist nach den bisherigen Analysen – ähnlich den Microsporidia – vermutlich in der Nähe der Zygomycota zu erwarten.

Literatur

BEAKES G.W. (1998): Relationships between lower fungi and protozoa. — In: COOMBS G.H., VICKERMAN K., SLEIGH M.A. & A. WARREN (eds.), Evolutionary relationships among protozoa. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht: 351–373.

BULLERWELL C.E., FORGET L. & F.B. LANG (2003): Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. — Nucleic Acids Res. **31**: 1614–1623.

CANNING E.U. (1998): Evolutionary relationships among Microsporidia. — In: COOMBS G.H., VICKERMAN K., SLEIGH M.A. & A. WARREN (eds.), Evolutionary relationships among protozoa. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht: 77–90.

CRAWLEY (1905) *Coelosporidium blattellae*, a new sporozoan parasite of *Blattella germanica*. — Acad. Nat. Sci. Phil. **57**: 158–161.

FABEL P., RADEK R. & V. STORCH (2000): A new spore-forming protist, *Nephridiophaga blaberi* sp.nov., in the death's head cockroach *Blaberus craniifer*. — Europ. J. Protistol. **36**: 387–395.

HASEGAWA M., KISHINO H. & K. YANO (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. — J. Mol. Evol. **22**: 160–174.

HIRT R.P., LOGSDON J.M., HEALY B., DOREY M.W., DOOLITTLE W.F. & T.M. EMBLEY (1999): Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA **96**: 580–585.

JENSEN A.B., GARGAS A., EILENBERG J. & S. ROSENDAHL (1998): Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota; Fungi) based on phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (ssu rDNA). — Fungal Genet. Biol. **24**: 325–334.

KAVENOFF R. & B.H. ZIMM (1973): Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*. — Chromosoma **41**: 1–27.

KEELING P.J. (2003): Congruent evidence from α-tubulin and β-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. — Fungal Genet. Biol. **38**: 298–309.

KIMURA M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. — J. Mol. Evol. **16**: 111-120.

KISHINO H. & M. HASEGAWA (1989): Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order of the Hominoidea. — J. Mol. Evol. **29**: 170-179.

KOWALJOWA W.J. & I.W. ISSI (1973): Microsporidia in natural populations of red (*Blattella germanica* L.) and black (*Blatta orientalis*) cockroaches. (in Russisch) — Med. Parazitol. Parazit. Bolezni **42**: 597-602.

KUMAR S., TAMURA K., JAKOBSEN I.B & M. NEI (2001): MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. — Bioinformatics **17**: 1244-1245.

LANGE C.E. (1993): Unclassified protists of arthropods: the ultrastructure of *Nephridiophaga periplanetae* (LUTZ & SPLENDORE, 1903) n.comb., and the affinities of the Nephridiophagidae to other protists. — J. Eukaryot. Microbiol. **40**: 689-700.

LUTZ A. & SPLENDORE A. (1903): Über Pebrine und verwandte Mikrosporidien. Ein Beitrag zur Kenntnis der brasilianischen Sporozoen. — Centr. Bakt. Parasitenkd. I. Abt., Orig. **33**: 150-157.

MEDLIN L., ELWOOD H., STICKEL S. & M.L. SOGIN (1988): The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. — Gene **71**: 491-499.

MULISCH M. (1993): Chitin in protistan organisms. Distribution, synthesis and deposition. — Europ. J. Protistol. **29**: 1-18.

PERRIN W.S. (1905): Preliminary communications on the life-history of *Pleistophora periplanetae* LUTZ and SPLENDORE. — Proc. Cambridge Philos. Soc. **13**: 204-208.

PURRINI K. & K. WEISER (1990): Light and electron microscope studies on a protozoan, *Oryctospora alata* n. gen., n. sp. (Protista, Coelosporidiidae), parasitizing a natural population of the Rhinoceros beetle, *Oryctes monoceros* Oliv. (Coleoptera, Scarabaeidae). — Zool. Beitr. **33**: 209-220.

PURRINI K., WEISER K. & G.-W. KOHRING (1988): *Coelosporidium tangae* n.sp. (Protista), a new protist parasitizing a natural population of a field cockroach, *Blatta* sp. (Blattaria). — Arch. Protistenkd. **136**: 273-281.

RAIKOV I.B. (1994) The diversity of forms of mitosis in protozoa a comparative review. — Europ. J. Protistol. **30**: 253-269.

RADEK R. & W. HERTH (1999): Ultrastructural investigation of the spore-forming protist *Nephridiophaga blattellae* in the Malpighian tubules of the German cockroach *Blattella germanica*. — Parasitol. Res. **85**: 216-231.

RADEK R., KLEIN G. & V. STORCH (2002): The spore of the unicellular organism *Nephridiophage blattellae*: ultrastructure and substances of the spore wall. — Acta Protozool. **41**: 169-181.

ROTH L.M. & E.R. WILLIS (1960): The biotic associations of cockroaches. — Smithsonian Misc. Collect. **141**: 1-470.

SPRAGUE V. (1970): Recent problems of taxonomy and morphology of Haplosporidia. — J. Parasitol. **56**: 327-328.

STEINBRÜCK G. & M. SCHLEGEL (1983): Characterization of two sibling species of the genus *Stylonychia* (Ciliata, Hypotricha): *S. mytilus* EHRENBERG 1838 and *S. lemnae* n.sp. II Biochemical characterization. — J. Protozool. **30**: 294-300.

STRIMMER K. & A. VON HAESELER (1996): A quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. — Mol. Biol. Evol. **13**: 964-969.

TANABE Y., O'DONNELL K., SAIKAWA M. & J. SUGIYAMA (2000): Molecular phylogeny of parasitic zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal RNA sequences. — Mol. Phylogenet. Evol. **16**: 253-262.

THOMPSON J.D., PLEWNIAK F. & O. POCH (1999): A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. — Nucleic Acids Res. **27**: 2682-2690.

USTINOVA J., KRIENITZ L., V.A.R. HUSS (2000): *Hyaloraphidium curvatum* is not a green alga, but a lower fungus; *Amoebidium parasiticum* is not a fungus, but a member of the DRIPs. — Protist **151**: 253-262.

VAVRA J. (1976): Structure of the microsporidia. — In: BULLA L.A. & T.C. CHENG (eds.), Comparative pathobiology, vol. **1**, Biology of the microsporidia, Plenum Press, New York: 1-85.

VOIGT K. & J. WÖSTEMEYER (2001): Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1? genes. — Gene **270**: 113-120.

VOSSBRINCK C.R., MADDOX J.V., FRIEDMAN S., DEBRUNNER-VOSSBRINCK B.A. & C.R. WOESE (1987): Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. — Nature **326** (6111): 411-414.

WOOLEVER P. (1966): Life history and electron microscopy of a haplosporian, *Nephridiophaga blattellae* (CRAWLEY) n.comb., in the Malphigian tubules of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). — J. Protozool. **13**: 622-642.

WYLEZICH C., MEISTERFELD R., MEISTERFELD S. & M. SCHLEGEL (2002): Phylogenetic analyses of small subunit ribosomal RNA coding regions reveal a monophyletic lineage of euglyphid testate amoebae (Order Euglyphida). — J. Euk. Microbiol. **49**: 108-118.

Anschriften der Verfasser:

Dr. Claudia WYLEZICH
Allgemeine Ökologie und Limnologie
der Universität zu Köln
Weyertal 119
D-50923 Köln, Germany
E-Mail: Claudia.Wylezich@uni-koeln.de

Dr. Renate RADEK
AG Protozoologie der Freien Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 1-3
D-14195 Berlin, Germany
E-Mail: rradek@zedat.fu-berlin.de

Prof. Dr. Martin SCHLEGEL
Molekulare Evolution und Systematik der Tiere
der Universität Leipzig
Brüderstaße 32
D-04103 Leipzig, Germany
E-Mail: schlegel@rz.uni-leipzig.de